



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출 원 번 호 : 10-2002-0068008
Application Number PATENT-2002-0068008

출 원 년 월 일 : 2002년 11월 05일
Date of Application NOV 05, 2002

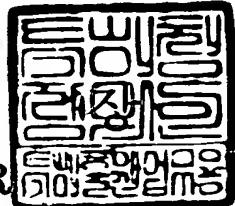
출 원 인 : 한국전자통신연구원
Applicant(s) Electronics and Telecommunications Research Institute



2003 년 01 월 08 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.11.05
【발명의 명칭】	PCR 파라미터의 주기적 변화를 수반한 다중 PCR 수행 방법
【발명의 영문명칭】	Performing Method of Multiplex PCR with cyclic changes of PCR parameters
【출원인】	
【명칭】	한국전자통신연구원
【출원인코드】	3-1998-007763-8
【대리인】	
【성명】	신영무
【대리인코드】	9-1998-000265-6
【포괄위임등록번호】	2001-032061-5
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박세호
【성명의 영문표기】	PARK, Se Ho
【주민등록번호】	710705-1573317
【우편번호】	305-345
【주소】	대전광역시 유성구 신성동 63-2번지 402호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	양해식
【성명의 영문표기】	YANG, Hae Sik
【주민등록번호】	690722-1574911
【우편번호】	302-777
【주소】	대전광역시 서구 둔산2동 샘머리아파트 202-1304
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이대식
【성명의 영문표기】	LEE, Dae Sik
【주민등록번호】	710501-1710710

【우편번호】 305-752
【주소】 대전광역시 유성구 송강동 청솔아파트 101-404
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 신용범
【성명의 영문표기】 SHIN, Yong Beom
【주민등록번호】 680102-1047813
【우편번호】 302-773
【주소】 대전광역시 서구 둔산동 럭키한마루아파트 105-404
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 김규원
【성명의 영문표기】 KIM, Kyu Won
【주민등록번호】 700714-1906419
【우편번호】 305-810
【주소】 대전광역시 유성구 전민동 370-6
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 윤태환
【성명의 영문표기】 YOON, Tae Hwan
【주민등록번호】 750116-1702610
【우편번호】 463-060
【주소】 경기도 성남시 분당구 이매동 아름마을 효성아파트
706-801
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 김성진
【성명의 영문표기】 KIM, Sung Jin
【주민등록번호】 771101-1100217
【우편번호】 305-350
【주소】 대전광역시 유성구 가정동 ETRI기숙사 218호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

김운태

【성명의 영문표기】

KIM, Yun Tae

【주민등록번호】

570415-1067426

【우편번호】

305-345

【주소】

대전광역시 유성구 신성동 한울아파트 110-106

【국적】

KR

【심사청구】

청구

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인
신영무 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 4 면 4,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 7 항 333,000 원

【합계】 366,000 원

【감면사유】 정부출연연구기관

【감면후 수수료】 183,000 원

【기술이전】

【기술양도】 희망

【실시권 허여】 희망

【기술지도】 희망

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 하나의 PCR 반응액으로부터 2개 이상의 PCR 산물을 얻는 다중 PCR (multiplex polymerase chain reaction) 방법의 개선에 관한 것이다. 즉, PCR 기기 내에 장치된 샘플로부터 2가지 이상의 DNA 증폭 산물을 얻기 위한 다중 PCR 방법에 있어서, 프라이머 숙성 온도와 신장 시간을 일정한 주기의 싸이클마다 변화시킴을 특징으로 하는 새로운 다중 PCR 방법을 제공하는 것이 본 발명의 목적이다. 본 발명의 방법에 의해 다중 PCR 을 수행하는 경우 종래의 다중 PCR에서 2쌍 이상의 프라이머가 프라이머-이량체를 생성하거나 혹은 PCR산물의 크기의 다양함으로 인해 PCR조건을 정하는 데 따른 제약을 해결할 수 있으며, 다양한 시료에 대하여 PCR 조건을 결정하는 데 소요되는 시간과 노력을 경감할 수 있다. 또한, 본 발명의 방법에 의하면 cDNA, 게놈성 DNA, 벡터등 정제된 DNA뿐만 아니라 혈액을 다중 PCR 샘플로 바로 이용할 수도 있으며, 극소량의 시료만으로도 PCR 증폭 반응을 수행할 수 있다.

【대표도】

도 1

【색인어】

다중 PCR, 혈액

【명세서】**【발명의 명칭】**

PCR 파라미터의 주기적 변화를 수반한 다중 PCR 수행 방법 {Performing Method of Multiplex PCR with cyclic changes of PCR parameters}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 실시예1에서 희석 혈액 샘플을 사용한 다중 PCR 수행 산물을 전기영동한 사진이다 (BF8, P5, BF5 큰 것 부터)

도 2는 희석혈액에서 1차 수득한 PCR 산물중에서 BF5 및 P5을 클로닝한 후 그 클로닝된 DNA를 주형으로 하여 실시예 2에서 수행한 다중 PCR 산물의 전기 영동 사진이다.

도 3a는 실시예 1 및 2에서 수득한 다중 PCR 산물중 BF5의 서열을 젠뱅크(genbank) 내 해당서열과 비교, 분석한 결과이다.

도 3b는 실시예 1에서 수득한 다중 PCR 산물중 P5의 서열을 젠뱅크내 해당서열과 비교, 분석한 결과이다.

도 3c는 실시예 1에서 수득한 다중 PCR 산물중 BF8의 서열을 젠뱅크내 해당서열과 비교, 분석한 결과이다.

도 3d는 실시예 2에서 수득한 다중 PCR 산물중 P1의 서열을 젠뱅크내 해당서열과 비교, 분석한 결과이다.

도 4a는 실시예 3에서 실리콘옥사이드 챔버(silicon oxide chamber)에서 P1 및 P5에 대해 미량 다중 PCR 수행후 형광현미경에서 관찰한 사진이다.

도 4b는 실시예 3에서 실리콘옥사이드 챔버에서 미량 PCR 수행함에 있어 P1 및 P5 주형 DNA가 없는 상태에서 다중 PCR 수행(negative control) 시험후 형광현미경에서 관찰한 사진이다.

도 5는 실시예 3에서 사용한 실리콘옥사이드 챔버의 디멘션(dimension)을 도시한 도면이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<10> 본 발명은 하나의 PCR 반응액으로부터 2가지 이상의 DNA 증폭 산물을 얻기 위한 다중 PCR 방법의 개선에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 기존 다중 PCR 반응에 있어서 2쌍 이상의 프라이머(primer)가 사용됨으로 인해 발생하는 프라이머의 이량체(dimer) 생성 문제, 비특이적 DNA 증폭 산물 생성 문제 및 원하는 다종의 증폭 산물간의 크기 차이를 크게 할 수 없는 문제점등을 해결하기 위한 새로운 다중 PCR 수행 방법에 관한 것이다.

<11> 단일염기이상(SNP:single nucleotide polymorphism), STR(short tandem repeat), 삽입(insertion), 결실(deletion) 및 돌연변이(mutation)등과 같은 생물체의 유전자의 이상 혹은 변이(variation)에 관한 연구, 질병진단, 병원균 동정등

을 위해서는 증폭된 타겟 DNA 서열의 확보가 선행되어야 한다. 타겟 DNA서열을 증폭하는 방법으로는 PCR(polymerase chain reaction), SDA(strand displacement amplification)과 같은 방법이 있고 mRNA로부터 타겟 DNA를 합성하는 TMA (transcription mediated amplification), NASBA(nucleic acid sequence based amplification) 등과 같은 방법이 있다. 일반적인 응용에서, 증폭 효율면에서 잇점을 갖고 있는 PCR 방법을 많이 사용하고 있다.

<12> 근래에는 랩온어칩(lab-on-a-chip)과 같이 작은 칩 혹은 작은 장비내에서 DNA 증폭을 이뤄내고 짧은 시간내에 DNA를 분석하기 위한 연구가 진행되고 있다.

<13> 하지만 공통적으로 안고 있는 문제는 혈액 샘플이나 조직 샘플로부터 게놈을 순수 정제하는 번거로움이나 적은 비용으로 최대한의 정보를 얻어내기 위해 칩과 같은 작은 공간내에서 최대한 다양한 타겟 유전자를 안정적으로 증폭해야 한다는 점이라고 할 수 있다. 한정된 공간에서 다양한 DNA 증폭 산물을 얻는 방법으로는 다중 PCR 방법이 있다.

<14> 다중 PCR이란 하나의 반응액으로부터 2가지 이상의 증폭 DNA 산물을 생산하는 PCR 방법으로 반응액 속에 2쌍 이상의 프라이머가 사용된다. 따라서 반응조건과 프라이머 서열이 적당하지 않으면 프라이머 이량체 생성, 비특이적 DNA 산물 생성과 같은 문제를 안고 있고 또 원하는 DNA 증폭 산물을 얻지 못하는 경우가 많다. 기존의 방법은 온도와 시간이 고정된 조건하에서 이루어지기 때문에 원하는 증폭 DNA 산물간의 크기차를 크게 설정하지 못하고 최적 조건을 찾기 위해 많은 시간과 노력이 필요하다. 예를 들어, Hinegariu O 등의 논문 "Multiplex PCR:critical

parameters and step-by-step protocol" (*Biotechniques*, 1997, pp. 504-511) 및 P. Markoulatos 등의 논문 "Multiplex Polymerase Chain Reaction: a practical approach" (*J. Clin. Lab. Anal.* 2002, pp. 47-51) 에서는 특정 샘플에 대해 프라이머 농도, Mg^{++} 농도, taq DNA 중합 효소 농도, 버퍼(buffer) 농도, 숙성(annealing, '가열' 또는 '결합'이라고 하는 경우도 있다) 온도, 신장(extension, '연장'이라고 하기도 한다) 시간 등의 PCR 반응 파라미터들의 다양한 조합에 대하여 최적 다중 PCR 반응 조건을 찾기 위한 실험을 수행하였다. 그러나, 이러한 방법은 파라미터의 조합이 너무 다양하여 상당한 시간과 노력 및 샘플 양이 필요하며, 증폭하고자 하는 샘플이 바뀌면 이러한 과정을 다시 반복해야 하는 문제점을 가지고 있었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <15> 이러한 문제점들에 대하여, 간단히 안정적인 PCR 반응을 수행할 수 있는 최적 PCR 조건을 찾아내는 방법을 제공하는 것이 본 발명의 목적이다.
- <16> 한편, 종래 다중 PCR 반응을 수행하는 데 있어서 요구되던 샘플, 특히 혈액 샘플의 경우 정제하지 않은 희석 혈액 샘플을 사용하는 다중 PCR 방법을 제공하는 것이 본 발명의 또 다른 목적이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <17> 본 발명자들은 상기와 같은 발명이 목적을 달성하기 위하여 연구를 거듭한

결과, 다중 PCR 반응의 여러 파라미터들 중에서 속성 온도와 신장 시간을 일정한 주기의 사이클마다 변화시킴으로써 다중 PCR 반응을 통하여 간단히 안정적으로 타겟 DNA 서열을 증폭시킬 수 있음을 밝혀내고 본 발명을 완성하였다.

<18> 또한, 혈액과 같은 조(raw) 샘플을 단순히 버퍼로 희석함으로써 정제하지 않고 직접 다중 PCR 반응에 이용하여 증폭을 수행함으로써 정제된 DNA를 얻기 위한 전처리 과정을 줄일 수 있음을 확인하였다.

<19> 또한, $1\mu\text{l}$ 정도의 극소량의 샘플을 사용하여 다중 PCR 반응을 수행하여 DNA를 증폭시킬 수 있음을 확인하였다.

<20> 최근 분자생물학의 기술의 눈부신 발전으로 인간의 게놈서열이 완전 분석되었을 뿐만 아니라 인간에게 유용하거나 연구가치가 높은 생물들의 게놈서열이 속속 완전 분석이 되어 발표되고 있다. 밝혀진 게놈서열(염기서열)이 의미를 갖고 또 인간이 이용하기 위해서는 단백질을 발현하는 유전자부분을 밝혀내고 그 유전자의 기능을 알아내야 한다. 최근 몇 년간 이러한 목적으로 급격히 발전되고 있는 분야는 DNA 칩 분야라고 할 수 있다. 생체의 외부로부터의 자극에 대한 유전자 발현 패턴, 특정 질환자의 유전자 발현 패턴등으로부터 미지 유전자의 기능을 밝혀나가는 연구가 진행되고 있다. 한편 게놈 연구가 진행됨에 따라 기능과 서열이 알려진 유전자라도 개인간의 서열이 아주 조금씩 다름이 알려지게 되었고 이런 개인간에 혹은 종 구성원간에 존재하는 염기서열 상의 차이를 SNP라고 한다. SNP는 개인간의 형질의 차이를 유발할 뿐만 아니라 약물에 대한 내성, 민감도, 심한 경우 유전적 질환의 원인이 되기도 한다. 이미 많은 연구소에는 알려진 인간 게놈으로부터 SNP 데이터베이스를 구축하고 이런 SNP와 약물(drug) 민감도, 질병 관련성을 알아내기 위해 노력하고 있다.

<21> 향후 축적된 유전자 관련 정보들은 많은 DNA 진단기기 개발에 이용될 것이다. 유전자 진단을 위해서는 샘플로부터 정제된 게놈을 얻어야 하고 관심있는 DNA부분을 증폭해 확보해야 한다. 이런 문제들은 진단기기의 소형화, 고속화의 장애가 되고 있다. 본 발명에서는 DNA 증폭에 직접 혈액을 사용하고, 여러 종류의 DNA 증폭 산물을 얻는 다중 PCR 방법으로 위와 같은 문제를 개선하고 극복할 수 있음을 보여준다.

<22> 본 발명은 혈액 샘플 및 정제된 DNA를 직접 이용하여 다중 PCR을 수행한 내용이다.

<23> 다중 PCR을 위해서 온도 및 기타 반응 조건의 조절에 관해 프로그램이 가능한 PCR 기기가 필요하다. PCR 반응은 변성 예비 단계, 변성 단계, 싸이클 단계(숙성 단계 및 신장 단계) 및 추가 신장 단계로 이루어지는 바, PCR 프로그램은 이들 각 단계의 온도 및 시간과 싸이클 단계의 싸이클 수의 설정치에 의해 구성된다. 본 발명의 PCR 수행 방법은 이러한 프로그램 설정치들 중 싸이클 단계의 숙성 및 신장 단계의 온도 및 시간을 다음과 같이 설정함으로써 달성된다:

<24> 숙성 단계 : $X^{\circ}\text{C}$, 30초, 단, 숙성 온도는 $a^{\circ}\text{C}$ 증가/매 b 싸이클로 설정한다;

<25> 신장 단계 : 72°C , Y 초, 단, 신장 시간은 c 초 증가/매 d 싸이클로 설정한다.

<26> 상기 PCR 프로그램 설정치에서, X , Y , a , b , c 및 d 값은 증폭하고자 하는 DNA의 크기, 사용되는 프라이머의 T_m 에 따라 적당히 조정한다. 구체적으로는 다음과 같이 결정 한다.

<27> X 값 : 사용하는 프라이머의 T_m 값 중 가장 낮은 값보다 2°C 낮은 값으로 설정한다.

<28> a 및 b 값 : a 값은 기본적으로 「 $(T_m$ 최고값 - T_m 최저값)」로, 1 싸이클에 대해 설정한다. 다만, T_m 값의 차가 작아서 PCR 기기상 a 값의 설정이 불가능할 경우에는 a 값의

변화주기, 즉 싸이클 수(b 값)를 바꿈으로서 조정한다. 예를 들면 $0.05^{\circ}\text{C}/\text{매 싸이클}$ 인 경우, $0.2^{\circ}\text{C}/\text{매 4 싸이클}$ 로 설정한다.

<29> Y 값 : 이 값은 증폭하고자 하는 PCR 산물 가운데 가장 작은 크기의 DNA 가 합성되는 데 필요한 시간 값을 설정하며 다음과 같이 결정한다.

<30> $Y(\text{sec}) = L_{\text{min}} / \text{taq DNA 중합효소의 DNA 합성 속도}(\text{bp/sec})$

<31> 상기 식에서, L_{min} 은 가장 작은 PCR 산물의 크기(bp, 염기쌍 수)를 나타내며, $\text{taq DNA 중합효소의 DNA 합성 속도}$ 는 경험적으로 산출하며, 일반적으로 13 bp/sec 의 값을 갖는다.

<32> c 값 : PCR 반응 증폭 산물 중 크기가 가장 큰 DNA가 합성되는 데 필요한 시간 값을 설정하며, 다음과 같이 결정한다.

<33> $c(\text{sec}) = [(L_{\text{max}} - L_{\text{min}}) / \text{taq DNA 중합효소의 DNA 합성 속도}(\text{bp/sec})] \times \text{총 싸이클} - 7$

<34> 상기 식에서, L_{max} 는 가장 큰 PCR 산물의 크기(bp)를 나타내고, L_{min} 은 가장 작은 PCR 산물의 크기를 나타낸다.

<35> 다만, 가장 큰 PCR 산물과 가장 작은 PCR 산물 간의 크기차($L_{\text{max}} - L_{\text{min}}$)가 크지 않아서 c값이 PCR 기기상에서 설정하기 불가능할 정도로 작은 경우 a값 설정할 때와 동일한 방식에 따라 변화주기 d(싸이클)값을 조정하여 해결한다.

<36> 증폭용 샘플은 정제된 DNA(벡터, 게놈 DNA, cDNA 라이브러리 등) 뿐만 아니라 희석된 혈액을 사용할 수 있다. 혈액을 바로 사용하면 혈장 단백질과 적혈구에서 유래한 단백질에 의해 PCR에 제대로 수행되지 않는다. 그러므로 미리 1x PCR 버퍼로 희석해서 혈

액 샘플을 준비한다. 희석비율은 1: 30 (혈액:버퍼)정도가 적당하였고 $50\mu\text{l}$ PCR 시 $2\mu\text{l}$ (희석된 혈액)를 사용하였다. 나머지 PCR 성분들의 농도는 일반적인 것과 큰 차이가 없다.

<37> 이하에서 실시예를 통하여 본 발명을 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 이해시키기 위해 예시한 것에 불과한 것으로써 본 발명의 보호 범위는 첨부된 특허청구 범위에 의해 정해지고 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 따라서, 본 발명의 기술적 사상의 범위내에서 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 하기 실시예로부터 다양한 변형 및 균등한 범위에서의 실시가 가능하지만 이들 모두는 본 발명의 기술적 사상의 보호 범위 내에 포함됨을 이해할 것이다.

<38> [실시 예 1]

<39> 혈액 샘플의 다중 PCR

<40> 인간 게놈내의 유방암, 난소암 관련 유전자인 brca1 및 brca2의 exon 서열 중에서, 그 서열에 돌연변이가 발생했을 때 암 발생확률이 높은 서열을 증폭 산물이 포함하도록 표 1과 같은 프라이머를 사용하였다.

<41>

【표 1】

프라이머 명	프라이머 서열	Tm(°C)	PCR 산물	
bf9	5'-TTTTAGCAAAAGCGTCCAGAA-3'	54.0	brca 1 exon 11	BF5
bf10	5'-TCGGTAGCAACGGTGCTATG-3'	59.4	brca 1 exon 11	
p9	5'-TTTGATTACTCAGTTAGAAAACC-3'	55.3	brca 2 exon 11b	P5
p10	5'-GAAACATTCACTAGTTTGTGCCATGAGC-3'	61.6	brca 2 exon 11b	
bf15	5'-GTCCAATTCAAATCACAGTTGGAGG-3'	62.2	brca 1 exon 11	BF8
bf16	5'-TCTTTAAGATAGTCATCTGGTTTCAGGCA-3'	62.7	brca 1 exon 11	
p1	5'-TGCTTGTGAATTCTGAGACGGATG-3'	61.6	brca 1 exon 11	P1
p2	5'-AACAGAACTACCTGATACTTTCTGGA-3'	62.2	brca 1 exon 11	

<42> 다중 PCR을 위한 샘플은 희석된 혈액을 직접 사용하였다. 샘플은 다음과 같이 준비하였다.

<43> 총 PCR 반응액 부피 : $50\mu\ell$

<44> 각 성분 최종 농도.

<45> 프라이머 농도 10pmol

<46> MgCl_2 2mM

<47> dNTP 2mM

<48> 10x PCR 버퍼 $5\mu\ell$

<49> taq DNA 중합효소 2.5 유니트

<50> 희석 혈액 $2\mu\ell$ (희석 비율 - 버퍼: 혈액 = 1:30)

<51> 초 순수(pure water) $50\mu\ell$ 가 되도록 보충한다.

<52> PCR 기기는 바이오라드(bio-rad)사의 모델 i cycler를 사용하였다. 이 기종은 프로그래밍이 가능한 컨트롤러가 장착된 기종으로써, 본 실시예에서는 다음과 같이 PCR 반응 파라미터를 설정하였다.

<53> 1. 변성 예비 단계 : 94°C, 4분

<54> 2. 싸이클 단계

<55> 변성 단계: 93°C, 30초

<56> 프라이머 숙성 단계 : 52°C, 30초 (0.2°C 증가/매 싸이클)

<57> 신장 단계 : 72°C, 15초 (1초 증가/매 3 싸이클)

<58> 40 싸이클

<59> 3. 추가 신장 단계

<60> 추가 신장 단계 : 72°C, 7분

<61> 본 실시예를 통해 증폭된 PCR 반응액을 전기 영동하고, EtBr(에티디움브로미드)형 광 처리한 아가로즈 젤(agarose gel) 사진을 도 1에 나타내었다. 도 1에서 보면, 1 레인은 1kb DNA 표지(marker), 3 레인은 상기의 방법과 조건으로 다중 PCR 수행한 결과를 나타낸다. 맨 아래 화살표에 해당하는 DNA부터 윗쪽으로 BF5, P5, BF8이며, 2 레인은 일반적인 PCR방법에서와 같이 프라이머 숙성단계와 신장단계 조건이 고정된 PCR을 수행한 결과이다. 2레인에 해당하는 PCR조건은 다음과 같다.

<62> 1. 변성 예비 단계 : 94°C, 4분

<63> 2. 싸이클 단계

<64> 변성 단계 : 93°C, 30초

<65> 프라이머 육성 단계 : 55°C, 30초

<66> 신장 단계 : 72°C, 40초

<67> 40 싸이클

<68> 3. 추가 신장 단계 : 72°C, 7분

<69> 증폭 산물의 염기 서열 확인

<70> 본 실시예 1에서 얻은 결과물(도1의 레인3)에 대하여 BF5(222bp), P5(317bp), BF8(468bp)를 아가로즈 젤로부터 각각 순수 분리하여 Topo PCR2.1 클로닝벡터 (Invitrogen사 제품)에 삽입하고 대장균에 형질 전환시켰다. 형질전환 대장균을 카나마이신(kanamycin)(50 μ g/ml)이 녹아있는 액체 배지(LB: luria broth)에서 배양하고 모은 후, 대장균으로부터 형질전환 DNA를 각각 순수 정제하고 염기서열 분석을 행하였다. 염기서열 분석결과와 젠뱅크(genbank)에 있는 해당서열을 비교하여 PCR산물을 확인하였으며, 그 결과를 도3a 내지 c에 나타내었다.

<71> 본 실시예를 통하여 희석 혈액을 다중 PCR의 주형으로 사용한 경우 주형 DNA를 순수분리 해야 하는 번거로움에서 벗어날 수 있음을 알 수 있으며 또한 고정된 조건에서 PCR을 수행하는 기존의 방법보다 주기적으로 조건이 바뀌도록 하는 본 발명의 다중PCR방식이 더 효율적임을 알 수 있다. 희석된 혈액을 주형으로 하더라도 남아있는 혈장단백질과 PCR중에 흘러나오는 적혈구 단백질은 DNA증폭에 방해 요소가 되므로 혈액속의 백혈구만을 부

분정제 혹은 순수분리하여 다중 PCR 반응에 사용한다면 보다 나은 결과를 얻는데 도움이 될 수 있다.

<72> [실시예 2]

<73> 순수정제된 DNA의 다중 PCR 반응

<74> 1x PCR 버퍼로 1:30 (헬액:버퍼)으로 희석한 혈액을 사용하여 P1과 P5를 각각 따로 PCR 한 후 실시예1에서와 동일한 방법으로 클로닝 및 염기서열분석을 수행하였다. (도3-4, 도 3-2)

<75> 실시예1과 같은 양과 농도의 PCR 구성요소를 하나의 tube에 넣었다. 단, PCR주형으로서 희석헬액 대신 P1과 P5 DNA가 클로닝된 DNA 각 20ng을 사용하였다. 해당 프라이머 쌍을 넣고 멸균된 물로 최종 50 μ l 부피로 만들었다. PCR 기기 및 다중 PCR 증폭 반응의 파라미터 설정은 실시예1에서와 동일한 방법으로 수행하였다. 아래는 설정한 다중 PCR 조건이다.

<76> 1. 변성 예비 단계 : 94°C, 4분

<77> 2. cyclic steps

<78> 변성 단계: 93°C, 30초

<79> 프라이머 숙성 단계 : 53°C, 30초 (0.2°C 증가/매 싸이클)

<80> 신장 단계 : 72°C, 15초 (1초 증가/매 3 싸이클)

<81> 35 싸이클

<82> 3. 추가 신장 단계

<83> 추가 신장 단계 : 72°C, 7분

<84> 도 2에 본 실시예에서 증폭한 P1 및 P5의 다중 PCR 산물의 전기 영동 사진을 나타내었다. 도 2에서, 레인 1은 50bp DNA 표지이고, 레인 2는 P1 및 P5를 다중 PCR한 결과인데, 두 개의 DNA 띠 가운데 아래쪽이 P1(127bp)이며 보다 위쪽의 것이 P5(317bp)이다.

<85> 또한, 실시예 1에서와 마찬가지로, P1 및 P5를 순수 분리 정제하고 클로닝한 후, 대장균에 형질 전환시키고 배양한 후 염기 서열 분석을 행하였다. 그 염기 서열 분석 결과를 젠뱅크의 해당 염기 서열과 비교한 결과를 도3b(P5의 염기서열분석 결과) 및

<86> 도3d(P1의 염기서열분석 결과)에 나타내었다.

<87> 본 실시예에서는 본 발명의 방법에 따라 PCR 파라미터를 설정함으로써 다중 PCR 반응을 1회 실시함으로써 2가지 DNA에 대한 다중 PCR 반응을 성공적으로 수행할 수 있음을 확인하였다. 다만, 여기서는 다중 PCR의 주형으로 순수 분리된 DNA를 사용함으로써 희석 혈액을 사용하는 것보다 선명한 결과를 얻을 수 있었다.

<88> 실시예 3

<89> 실리콘 챔버에서의 미량 다중 PCR의 수행

<90> 실리콘 웨이퍼(silicon wafer)에 KOH 습식 에칭(wet etching) 방법으로 $0.2\mu\text{l}$ 부피를 갖는 사각형 챔버(chamber)를 제작한 후 CVD법(화학 증기 증착법)으로 실리콘 옥사이드를 증착하여 표면이 친수성을 띠도록 처리하였다. 실시예 2에서와 같은 PCR 혼합액을 $50\mu\text{l}$ 부피로 제조한 후 그 중 $0.2\mu\text{l}$ 를 챔버에 투입하고 광유(mineral oil)로 덮어서 증발을 방지하였다. 다만, PCR 혼합액에는 1x SYBR 그린(green) I 형광염색물질을 첨가하였다. SYBR 그린 I은 PCR 산물과 같이 이중사슬의 DNA속에 있을 때만 강하게 형광을 발산하기 때문에 PCR 증폭 결과를 확인할 수 있게 한다. 따라서, PCR 증폭이 제대로 진행되지 않았을 경우 형광이 잘 보이지 않게 된다.

<91> 대조 실험(Negative control)으로서 나머지 구성물은 동일하게 첨가되었으나 주형 DNA(P1 또는 P5가 클로닝된 벡터 DNA)를 넣지 않은 PCR 혼합물을 제조하여 동일한 방법으로 시료를 준비하였다.

<92> 상기와 같이 준비된 2개의 실리콘 옥사이드 챔버를 PCR기기 (bio-rad사의 i cycler)의 PCR 투브홀 상단에 장착하고 PCR 반응을 수행하였다.

<93> PCR 조건은 다음과 같이 설정하였다. 실리콘재질이 일반적인 PCR 투브 재질보다 열전도도가 훨씬 높기 때문에 각 단계의 시간 조건을 더 짧게 설정하였다.

<94> 1. 변성 예비 단계 : 94°C , 4분

<95> 2. 싸이클 단계

<96> 변성 단계: 93°C , 15초

<97> 프라이머 육성 단계 : 53°C , 15초 (0.2°C 증가/매 싸이클)

<98> 신장 단계 : 72℃, 15초 (1초 증가/매 3 싸이클)

<99> 35 싸이클

<100> 3. 추가 신장 단계

<101> 추가 신장 단계 : 72℃, 3분

<102> 미량 PCR 반응 결과는 형광현미경을 통해 확인하였으며, 그 결과를 도 4a 및 b에 나타내었다.

<103> 도 4a는 P1 및 P5의 다중 PCR 반응을 $0.2\mu\ell$ 실리콘 챔버에서 수행한 결과이며, 도 4b는 대조실험(주형없이 수행한 다중 PCR)의 결과이다. 도4에서 보면, 대조실험 결과인 도 4b에서는 형광이 거의 나타나지 않으나, 본 실시예 3의 결과인 도 4b에서는 형광이 강하게 나타나는 것을 확인할 수 있어, 본 발명의 방법에 의하면 $0.2\mu\ell$ 의 미량 시료에 대해서도 다중 PCR 반응이 성공적으로 진행될 수 있음을 확인할 수 있다. 적은 부피에서 정상적인 PCR 반응을 수행할 수 있게 됨으로써 유전자 진단기기내 DNA 증폭부의 크기를 줄이는 데 본 발명의 방법이 도움이 될 수 있다.

【발명의 효과】

<104> 이상에서 설명한 바와 같이 프라이머 숙성 온도와 신장 시간을 일정 주기의 싸이클마다 변화되도록 설정함으로써 다중 PCR의 문제점인 프라이머 이량체(dimer) 생성, 비특이적 산물(non-specific product)의 생성을 막을 수 있었을 뿐만 아니라 기존의 방식과 같이 PCR 샘플들의 각 성분의 농도를 조금씩 바꿔 가면서 다중 PCR 최적 조건을 찾아가

는 것보다 훨씬 짧은 시간에 원하는 PCR 산물을 얻어낼 수 있었다. 일정 주기의 싸이클마다 속성 온도와 신장 시간 증가폭, 혹은 감소폭을 실험자가 적절히 조정함으로써 보다 쉽게 다중 PCR 산물을 얻어낼 수 있었다.

<105> 또한, 혈액 샘플은 정제 과정 없이 희석처리만 한후 본 발명의 방법에 따라 다중 PCR을 통해 증폭될 수 있었다. 또한 본 발명의 방법에 따른 다중 PCR 방법은 $1\mu\text{l}$ 미만의 미량의 샘플만으로도 PCR 반응을 수행할 수 있어서 한정된 좁은 공간에서 다양한 PCR 산물을 만들어내고 분석해야 하는 랩온어칩(lab-on-a-chip) 형태의 DNA 분석 칩에서 상당히 유용하게 응용될 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

PCR 기기 내에 장치된 샘플로부터 2가지 이상의 DNA 증폭 산물을 얻기 위한 다중 PCR 방법에 있어서, 프라이머 숙성 온도와 신장 시간을 일정한 주기의 싸이클마다 변화 시킴을 특징으로 하는 다중 PCR 방법.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 샘플은 혈액, 혈장, 원형 DNA(벡터), cDNA 라이브러리, 게놈 또는 게놈을 포함하고 있는 세포 조직인 것을 특징으로 하는 다중 PCR 방법.

【청구항 3】

제2항에 있어서, 혈액은 희석 혈액인 것을 특징으로 하는 다중 PCR 방법.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 PCR 기기는 일정한 주기의 싸이클마다 온도 및 시간 파라미터를 변경, 설정할 수 있는 것임을 특징으로 하는 다중 PCR 방법.

【청구항 5】

제1항에 있어서, 상기 숙성 온도는 및 신장 시간은 일정한 주기의 싸이클마다 증가함을 특징으로 하는 다중 PCR 방법.

【청구항 6】

제6항에 있어서, 상기 숙성 온도는 1 싸이클에 대해 $(T_m\text{최고값} - T_m\text{최저값})$ 만큼 증가하고, 신장 시간은 1 싸이클에 대해 $[(L_{\text{max}} - L_{\text{min}}) \div \text{aq DNA 증합효소의 DNA 합성 속도} (\text{bp/sec})] \div (\text{총 싸이클} - 7)$ (여기서, L_{max} 는 가장 큰 PCR 산물의 크기(bp)를

나타내고, L_{min} 은 가장 작은 PCR 산물의 크기를 나타낸다) 만큼 증가하는 것을 특징으로 하는 다중 PCR 방법.

【청구항 7】

제2항에 있어서, 상기 샘플은 그 부피가 $1\mu\ell$ 미만인 것을 특징으로 하는 다중 PCR 방법.

1020020068008

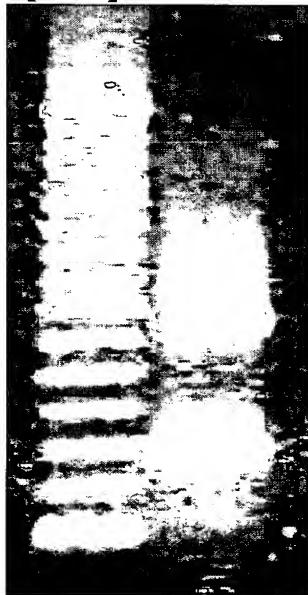
출력 일자: 2003/1/9

【도면】

【도 1】



【도 2】



【도 3a】

상하 : BFS (from genbank)
서열분석결과

```

1 TTTTAGCAAAAGCGTCCAGAAAGGAGAGCTTAGCAG
-----
101 CAGAATTGCCCTTTAGCAAAAGCGTCCAGAAAGGAGAGCTTAGCAG
37 GAGTCCTAGCCCTTCACCCATACACATTGGCTCAGGGTTACCGAAGAG
151 GAGTCCTAGCCCTTCACCCATACACATTGGCTCAGGGTTACCGAAGAG
87 GGGCAAGAAATTAGAGTCCTCAGAAGAGAACTTATCTAGTCAGGATGAA
201 GGGCAAGAAATTAGGGTCCTCAGAAGAGAACTTATCTAGTCAGGATGAA
137 GAGCTTCCCTGCTTCAACACTTGTATTGGTAAAGTAAACAAATATACCC
251 GAGCTTCCCTGCTTCAACACTTGTATTGGTAAAGTAAACAAATATACCC
187 TTCTCAGTCTACTAGGCATAGCACCGTTGCTACCG
301 TTCTCAGTCTACTAGGCATAGCACCGTTGCTACCGAAAGGGCGCAATTCAG

```

【도 3b】

상하 : p5 (from genbank)
상하 : 서열분석결과

1 TTTGAATTACTCAGTTT
-----||||||||||||||||
51 TAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCCGCCCTTTGAATTACTCAGTTT
||||||||||||||||||||||||
19 AGAAAACCAGCTACATATTGAGAAGAGTACATTTGAAGTGCTGAAAA
||||||||||||||||||||||||
100 AGAAAACCAGCTACATATTGAGAAGAGTACATTTGAAGTGCTGAAAA
||||||||||||||||||||
69 CCAGATGACTATCTTAAAGACCACTTCTGAGGAATGAGAGATGCTGATC
||||||||||||||||||||||||
150 CCAGATGACTATCTTAAAGACCACTTCTGAGGAATGAGAGATGCTGATC
||||||||||||||||||||
119 TTCACTGTCTAAATGAATGCCCATCGATTGGTCAGGTAGACACCCAGCAAG
||||||||||||||||||||
200 TTCACTGTCTAAATGAATGCCCATCGATTGGTCAGGTAGACACCCAGCAAG
||||||||||||||||||||
169 CAATTGAGGTACAGTTGAATTAAACGGAGTTGCTGGCTGTTGAAG
||||||||||||||||||||
250 CAATTGAGGTACAGTTGAATTAAACGGAGTTGCTGGCTGTTGAAG
||||||||||||||||||||
219 AAATGACTGTAAACAAAAAGTGTCTGGTTATTTAACAGATCAAAATGAAG
||||||||||||||||||||
300 AAATGACTGTAAACAAAAAGTGTCTGGTTATTTAACAGATCAAAATGAAG
||||||||||||||||||||
269 TGGGGTTTAGGGCTTTTATTCTGCTCATGGCACAAACTGAATGTTTC
||||||||||||||||||||
350 TGGGGTTTAGGGCTTTTATTCTGCTCATGGCACAAACTGAATGTTTC
||||||||||||||||||||

【도 3c】

상 : BF8 (from genbank)

하 : 소연문석(小研文石)

1 GTCCCAATTTCRAATTCACAGTTGGAGGTAGCTTCAGA

1 GAAATTGCCCTTGTCCCAATTTCACAGTTGGAGGTAGCTTCAGA

39 ACAGCTTCAAAATAGGAAATCAAGCTCTGAAACATACATTAAAGAACAG
|||||||
51 ACAGCTTCAAAATAGGAAATCAAGCTCTGAAACATACATTAAAGAACAG

89 CAAAATTTCTTCAAAGATATTGAAGAACAAATCCTACTAGTTAGCTT
|||||||
101 CAAAATTTCTTCAAAGATATTGAAGAACAAATCCTACTAGTTAGCTT

139 GTGTTGAAATTGTAATAACCTTGGCATTAGATAATCAAAAGAAACTGAGC

151 GTGTTGAAATTGTAATAACCTTGGCATTAGATAATCAAAAGAAACTGAGC

189 AAGCCTCACTCAATTAACTACTGTATCTGCACATTTCAGAGCTAGTGTAGT

201 AAGCCTCACTCAATTAACTACTGTATCTGCACATTTCAGAGCTAGTGTAGT

239 TTTTCTGATTGTAARAAATAGTCATAAACCCCTCAGATTTTCA
|||||||
251 TTTTCTGATTGTAARAAATAGTCATAAACCCCTCAGATTTTCA

289 ACCAGGATTAACTTCAAAACCATATAACCTAGCCAAAAGGCAGAA
|||||||
301 ACCAGGATTAACTTCAAAACCATATAACCTAGCCAAAAGGCAGAA

339 ATTACAGAATTTCTACTATATTAGAACAAATCAGGAAAGTCAGTTT GAA
|||||||
351 ATTACAGAATTTCTACTATATTAGAACAAATCAGGAAAGTCAGTTT GAA

388 TTACTCAGTTAGAAACCAAGCTACATATTCCAGAACAGACTACATTGAA
|||||||
401 TTACTCAGTTAGAAACCAAGCTACATATTCCAGAACAGACTACATTGAA

438 GTCCCTGAAACCAAGATCACTATCTTAAAGA
|||||||
451 GTCCCTGAAACCAAGATCACTATCTTAAAGACTGTAAAGGGCAATTTC

【도 3d】

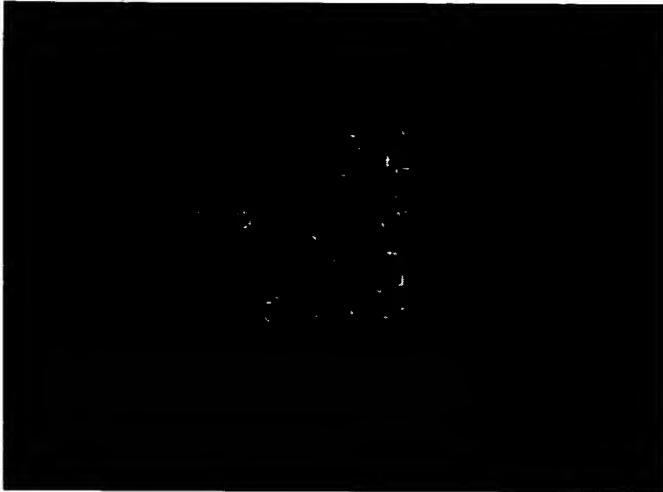
상 : P1(from genbank)

3) 서열분석 결과

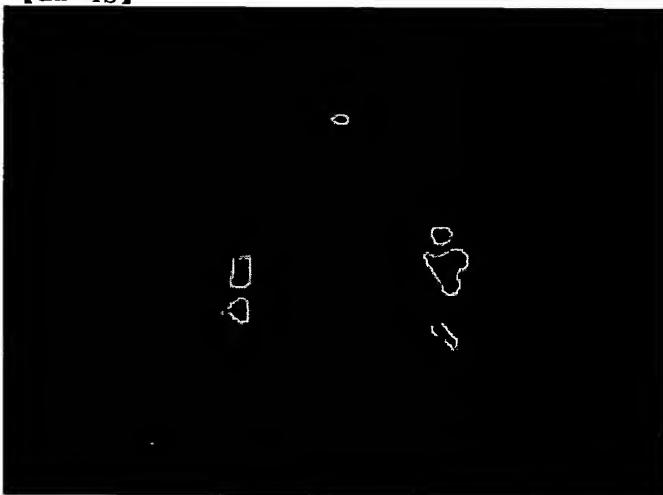
1020020068008

출력 일자: 2003/1/9

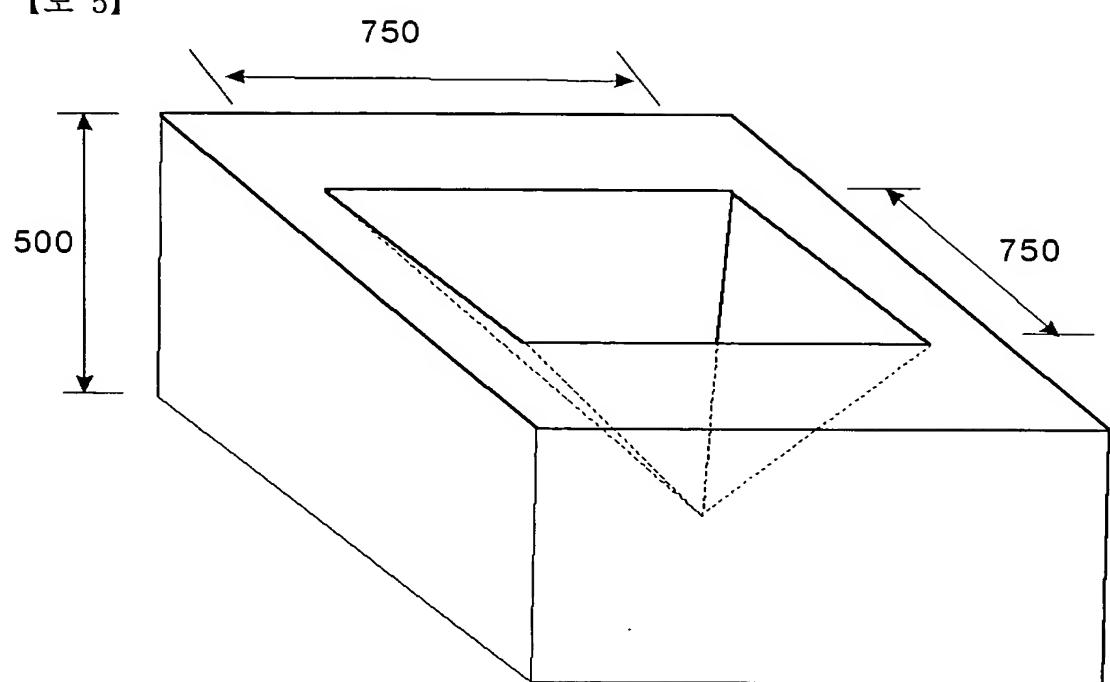
【도 4a】



【도 4b】



【도 5】



단위: micrometer